

Rec'd ST/PTO

02 FEB 2005

90/1-22877
PCT/JP 03/09801

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

01.08.03

REC'D 19 SEP 2003

WIFO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月 2日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-226196
[ST. 10/C]: [JP 2002-226196]

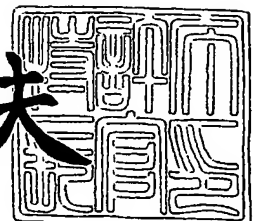
出 願 人
Applicant(s): 住友製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2003-3072217

【書類名】 特許願

【整理番号】 132986

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 35/74

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市蔵垣内 1 丁目 3 番 4 5 号 住友製薬株式会社内

【氏名】 野村 武彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社内

【氏名】 砂川 洵

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100121588

【弁理士】

【氏名又は名称】 五十部 穰

【電話番号】 06-6466-5214

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205876

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細菌細胞壁骨格成分製剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細菌-CWSと油状物との混合油状物（ペースト）であり、0.7 poise（25℃）以下の粘度を有する細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 2】 0.2～0.7 poise（25℃）の粘度を有する請求項 1 記載の細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 3】 以下の①～②の性質を有することを特徴とする細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

①粘度が0.26～0.55 poise（25℃）である。

②細菌-CWSの粒子径が0.15～6 μ mである。

【請求項 4】 細菌-CWSがBCG-CWSである、請求項 1～3 のいずれか記載の細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 5】 油状物が、スクワラン、スクワレン、シンセラン 4、落花生油、ツバキ油、大豆油、流動パラフィン、およびオレイン酸エチルの中から選ばれる 1 または複数の油状物の混合物である、請求項 1～4 のいずれか記載の細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 6】 油状物が、スクワラン、スクワレン、大豆油、流動パラフィンおよびオレイン酸エチルの中から選ばれる 2 種類の油状物の混合物である、請求項 5 記載の細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 7】 油状物が、大豆油、流動パラフィンおよびオレイン酸エチルの中から選ばれる 1 種の油状物とスクワランとの混合物である、請求項 6 記載の細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 8】 油状物が、オレイン酸エチルとスクワランとの 1：1 の混合物である、請求項 7 記載の細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 9】 油状物が、スクワランである、請求項 5 記載の細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 10】 細菌-CWSがBCG-CWSであって、BCG-CWS約 0.67 gに対して、スクワラン 6.6 g～35.2 gを含有することを特徴とする、請求項 1～3

のいずれか記載の細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 11】以下の（１）および（２）の工程を含むことを特徴とする、細菌-CWS混合油状物（ペースト）の製造方法。

- （１）細菌-CWS、および油状物を、有機溶媒中で混合する工程、
- （２）（１）の有機溶媒を留去する工程。

【請求項 12】有機溶媒がエーテル系溶媒である、請求項 11 記載の製造方法。

【請求項 13】有機溶媒が炭化水素系溶媒、またはハロゲン化炭化水素系溶媒である、請求項 11 記載の製造方法。

【請求項 14】有機溶媒がハロゲン化炭化水素系溶媒であって、該ハロゲン化炭化水素系溶媒が、1, 2-ジクロロエタン、クロロホルム、またはジクロロエタンである、請求項 13 記載の製造方法。

【請求項 15】有機溶媒が炭化水素系溶媒であって、該炭化水素系溶媒が、ヘプタン、またはヘキサンである、請求項 13 記載の製造方法。

【請求項 16】有機溶媒が、5～20%（V/V）のアルコール系溶媒を含むことを特徴とする、請求項 13～15 のいずれか記載の製造方法。

【請求項 17】請求項 11～16 のいずれか記載の製造方法によって得られる細菌-CWS混合油状物（ペースト）。

【請求項 18】細菌がBCG菌であることを特徴とする請求項 17 記載の混合油状物。

【請求項 19】油状物がスクワラン、または流動パラフィンであることを特徴とする、請求項 17 または 18 記載の混合油状物（ペースト）。

【請求項 20】請求項 1～10、および 17～19 のいずれか記載の細菌-CWS油状物（ペースト）、界面活性剤、および安定化剤を含有することを特徴とする水中油型エマルジョン製剤。

【請求項 21】水懸濁液 2Lあたり、0.66g～3.35g の細菌-CWS、および 0.4%～8% の油状物を含有することを特徴とする、請求項 20 記載の水中油型エマルジョン製剤。

【請求項 22】安定化剤として 1～10% のマンニトールを含有する請求項 2

0 または 21 記載の水中油型エマルション製剤。

【請求項 23】 界面活性剤として 0.01%～1.0% のポリエチレンオキシソルビタン脂肪酸エステルを含有する請求項 20～22 のいずれか記載の水中油型エマルション製剤。

【請求項 24】 ポリエチレンオキシソルビタン脂肪酸エステルがツイーン 80 である請求項 23 記載の水中油型エマルション製剤。

【請求項 25】 以下の①～②の特徴を有する請求項 20～24 のいずれか記載の水中油型エマルション製剤。

①エマルション油滴粒子径が、0.2～30 μm である。

②細菌-CWS が油滴中に包含され、レクチン反応が陰性を示す。

【請求項 26】 以下の (1)～(2) の工程を含むことを特徴とする、請求項 20～25 のいずれか記載の水中油型エマルション製剤の製造方法。

(1) 請求項 1～10、および 17～19 のいずれか記載の細菌-CWS 混合油状物（ペースト）と、界面活性剤を含む水溶液の混合液を、曇天以上の温度で乳化する工程、

(2) 安定化剤を含む水溶液を加えて希釈する工程。

【請求項 27】 前項の (1) における乳化する工程が、以下の (3)～(4) の工程を含むことを特徴とする請求項 25 記載の製造方法。

(3) 請求項 1～10、および 17～19 のいずれか記載の細菌-CWS 混合油状物（ペースト）と、0.02%～0.8% の界面活性剤を含む水溶液の混合液を乳化する工程（粗乳化工程）、

(4) (3) の混合液に界面活性剤を含む水溶液を加えて界面活性剤濃度を調整し、強撹拌して本乳化を行う工程。

【請求項 28】 界面活性剤がポリエチレンオキシソルビタン脂肪酸エステルである請求項 27 記載の水中油型エマルション製剤の製造方法。

【請求項 29】 ポリエチレンオキシソルビタン脂肪酸エステルがツイーン 80 である請求項 28 記載の水中油型エマルション製剤の製造方法。

【請求項 30】 安定化剤がマンニトールである請求項 26～29 のいずれか記載の水中油型エマルション製剤の製造方法。

【請求項 3 1】 請求項 2 0 ～ 2 5 のいずれか記載のエマルション製剤を凍結乾燥することによって得られる、凍結乾燥製剤。

【請求項 3 2】 粒度分布において、粒子径が、 $0.15 \sim 6 \mu\text{m}$ であることを特徴とする、細菌の細胞壁骨格成分（細菌-CWS）。

【請求項 3 3】 粒度分布において、粒子径が、 $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$ であることを特徴とする、細菌の細胞壁骨格成分（細菌-CWS）。

【請求項 3 4】 粒度分布において、D10%が 0.23 ± 0.05 であり、D90%が 0.60 ± 0.05 であり、かつ、単一ピークを有することを特徴とする請求項 3 2 又は 3 3 記載の細菌の細胞壁骨格成分（細菌-CWS）。

【請求項 3 5】 脂肪族炭化水素系溶媒を含む溶媒中で分散することを特徴とする、請求項 3 2 ～ 3 4 のいずれか記載の細菌-CWSの製造方法。

【請求項 3 6】 溶媒が、脂肪族炭化水素系溶媒と、アルコール系溶媒の混合物であることを特徴とする請求項 3 5 記載の製造方法。

【請求項 3 7】 溶媒が、5～20%エタノールを含むヘプタンであることを特徴とする請求項 3 6 記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細菌の細胞壁骨格成分（細菌-CWS）を有効成分として含有する凍結乾燥製剤、該凍結乾燥製剤の製造中間体、および該凍結乾燥製剤ならびに該製造中間体の製造方法に関するものである。詳しくは、①優れた安定性を有し、凍結乾燥可能な、細菌の細胞壁骨格成分を有効成分とする、水中油型エマルション製剤、②復水安定性に富む該水中油型エマルション製剤の凍結乾燥製剤、③①～②の原料である、細菌-CWSおよび細菌-CWS混合油状物（ペースト）、④①～③の製造方法、に関する。本発明の水中油型エマルション製剤は、癌免疫療法において、すぐれた免疫賦活作用を示す、という特徴を有する。

【0002】

【従来の技術】

微生物死菌、細菌の細胞壁骨格成分（以下細菌-CWSと略する。）は、免疫賦

活作用を有し、例えば動物モデルを用いた実験的腫瘍系、およびヒト癌の免疫療法において抗腫瘍活性を示すことが知られている。しかも、上記の細胞壁骨格成分を油成分中に分散、乳化させ、水中油型エマルジョン製剤として投与した場合、免疫賦活作用による抗腫瘍効果などが著しく高まることが知られている。

【0003】

例えばウシ型結核菌の細胞壁骨格成分(以下、BCG-CWSと略する。)の水中油型エマルジョンを用いた癌免疫療法では、ヒトの癌治療において優れた成績が得られたことが報告されている(Pro.Japan Acad., 70, Ser.B 205-209(1994)、Pro.Japan Acad., 74, Ser.B 20550-55(1998))。

前記水中油型エマルジョン製剤は、細菌-CWSを油状物中に分散したペースト状の原体に、界面活性剤を含む水を加えてエマルジョン化する等して調製することができる(J.Nat.CancerInst.48, 831-835(1972)、J.Bacteriol, 92, 869-879(1966)、Gann, 69, 619-626(1978))。前記水中油型エマルジョン製剤は、細菌-CWSを油状物中に分散したペースト状の原体に、界面活性剤を含む水を加えてエマルジョン化する等して調製することができる(J.Nat.CancerInst.48, 831-835(1972)、J.Bacteriol, 92, 869-879(1966)、Gann, 69, 619-626(1978))。しかし、細菌-CWSを含有する水中油型エマルジョン製剤は、非常に不安定であり、数日で不溶性凝集物が生成する。その傾向は油成分の量が少ない場合、特に顕著である。一方、油成分の多い水中油型エマルジョン製剤は、投与された生体への負担が大きく、副作用をもたらす可能性がある。そのため、現在、臨床現場では、使用時に少量の水中油型エマルジョン製剤を用時調製している。しかし、用時調製では、常に一定の製剤を手作業で調製することは難しく、事実上医薬品としての実用化は不可能である。また、水中油型エマルジョン製剤を凍結乾燥して、保存安定性の高い凍結乾燥製剤とし、使用時に分散溶媒を加えて水中油型エマルジョン製剤を復元させる方法が、臨床現場での使い易さ、該製剤の保存安定性の点から好ましいが、十分な復水安定性を有し、それ自体安定で大量生産が可能な凍結乾燥製剤は得られていない。

そのため、恒常的な安定生産が可能な、より安定な水中油型エマルジョン製剤、および凍結乾燥製剤が求められている。

【0004】

一方、該水中油型エマルション製剤、および凍結乾燥製剤を製造するための、ペースト状の製造中間体（混合油状物）についても、油状物の量が少ない場合には、細胞壁骨格成分を油状物に均一に分散させるのが難しく、機械化と大量生産が困難であった。

【0005】

すなわち、細菌-CWSを有効成分とする、均一かつ安定な製品としての凍結乾燥製剤、該製剤を大量スケールで製造するための混合油状物（ペースト）および水中油型エマルション、およびそれらの大量スケールでの製造方法が充分確立するには至っていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、①細菌の細胞壁骨格成分を有効成分とする、安定で凍結乾燥可能な水中油型エマルション製剤、②①記載の水中油型エマルション製剤の、復水安定性に富む凍結乾燥製剤、③①～②記載の製剤の原料である、細菌-CWSおよび細菌-CWS混合油状物（ペースト）、④①～③の製造方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、細菌-CWSを有効成分として含有する安定性に富む水中油型エマルション製剤、および凍結乾燥製剤を得るべく、細菌-CWS、油状物、界面活性剤、および安定化剤等の組成、および製造工程について、鋭意検討を行った。まず、安定な水中油型エマルション製剤および、優れた復水安定性を有する該エマルション製剤の凍結乾燥製剤を良好に製造するには、原料となる細胞壁骨格成分の混合油状物（ペースト）の性状が非常に重要であると考えた。そこで、油状物の種類、油状物の組成、および油状物と細胞壁骨格成分の比率等を指標として、詳細に検討を進めたところ、安定な水中油型エマルション製剤の性状を左右する大きなファクターは、細菌-CWSと油状物からなる細胞壁骨格成分混合油状物（ペースト）の粘度であることを見出した。また、良好な粘度を得るための、細胞

壁骨格成分と油状物の比率を明らかにした。

すなわち、細菌-CWSは、水、油状物のいずれにも溶解しないため、均一な粒度分布を有するエマルション製剤とするのが困難である。特に、油状物の粘度が高い場合、混合攪拌時に均一に細菌-CWSを油状物中に拡散させることができないことがわかった。種々の油状物を用いて検討したところ、油状物の種類によらず、ある一定の粘度以下で、エマルション化に適した細菌-CWS混合油状物が得られることがわかった。具体的には粘度約0.7 poise以下の細菌-CWS混合油状物を用いて乳化工程を行えば、良好な粒度分布を示すエマルション製剤が得られることがわかった。

一方で、細菌-CWSに対する油状物の割合が高く、低い粘度を有する細菌-CWS混合油状物を用いた場合、問題なくエマルション製剤を得ることができるものの、凍結乾燥後に水を加えて復水した場合、好適な粒度分布のエマルション製剤が再現できないことも判明した。鋭意検討した結果、粘度約0.2 poise以上の細菌-CWS混合油状物であれば、凍結乾燥後の復水安定性も維持できることがわかった。

また、細菌-CWSを有効成分として含有する凍結乾燥製剤においては、細菌-CWS、油状物、界面活性剤、および安定化剤の重量比によって、その安定性、および復水した後に得られる水中油型製剤の粒度分布（復水安定性）等の製剤品の品質は、大きく異なっていた。

前記国際公開公報W000/3724に記載されたグリシンを安定化剤として用いる方法が知られているが、より安定な凍結乾燥製剤を得るためには、約900mM～1200mM（約6.9%～9.2%）のグリシンが必要であることがわかった。しかし、グリシンの場合300mM（2.3%）が等張濃度であるため、このような高濃度では生体への負担が懸念された。そこで、鋭意検討した結果、安定化剤としてマンニトールを用いることにより、復水安定性に富む凍結乾燥製剤を製造できることがわかった。マンニトールは、細菌-CWSを有効成分として含有する凍結乾燥製剤における安定化剤として公知のものであるが、これまでに報告された例では、細菌-CWS数mgスケールで製造しており、数百mg以上のスケールでの製造例は報告されていなかった。しかも、これまで報告されている凍結乾燥製剤は、安定性に欠け

るものであった。

本発明者は鋭意検討した結果、1～10%、好ましくは1～5%のマンニトールを安定化剤として用いることによって、凍結乾燥製剤の安定性、および復水した場合の水中油型エマルジョンの安定性に富むことがわかった。

【0008】

更に、発明者は、該細菌-CWS混合油状物（ペースト）の製造工程について検討した。

既に、細菌-CWSと油状物を混合する際、有機溶媒で一旦希釈して攪拌した後、溶媒を留去する方法が、前記国際公開公報W000/3724に記載されているが、本方法で調製した細菌-CWS混合油状物（ペースト）では、粒度分布が広く、2ピークを示し、ペーストの均一性が十分ではなかった（図1）。すなわち、粒子径が約10 μ mの巨大粒子が混在しており、水中油型エマルジョンを調製した場合に、ロット間のばらつきを生じやすい傾向があった。

発明者らは、種々の有機溶媒を用いて、鋭意検討を行ったところ、疎水性溶媒を用いることによって、極性溶媒を用いた場合よりも優れた細菌細胞壁骨格成分混合油状物（ペースト）を得られることがわかった。すなわち、エタノール、酢酸エチル、アセトン、トルエン等を単独で用いた場合、分散が不十分になり、得られてくる細菌細胞壁骨格成分混合油状物（ペースト）の粒子は若干粗い粒子のものが混在し、粒度分布幅も広がったが、ヘキサン、ヘプタン等の脂肪族炭化水素、または、クロロホルム等のハロゲン系溶媒、またはテトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒といった、非極性溶媒を用いると、より均一な分散溶液が得られ、均一性に優れたペーストを得られることがわかった。

更に、鋭意検討した結果、アルコール系溶媒を含む非極性溶媒を用いることによって、非極性溶媒のみを用いた場合よりも優れた細菌-CWS混合油状物（ペースト）を得られることがわかった。又、BCG-CWSについても、非極性溶媒又は本発明は、上記の知見に基づき、完成するに至ったものである。

【0009】

すなわち、本発明は、

[1] 細菌-CWSと油状物との混合油状物（ペースト）であり、0.7poise（2

5℃)以下の粘度を有する細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[2] 0.2~0.7 poise (25℃)の粘度を有する[1]記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[3] 以下の①~②の性質を有することを特徴とする細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

①粘度が0.26~0.55 poise (25℃)である。

②細菌-CWSの粒子径が0.15~6 μm である。

[4] 細菌-CWSの粒子径が、0.2 μm ~2 μm であることを特徴とする、[3]記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[5] 細菌-CWSの粒子径において、D10%:0.38 μm 以上、D90%:0.70 μm 以下であることを特徴とする[3]又は[4]記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[6] 細菌-CWSがBCG-CWSである、[1]~[5]のいずれか記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[7] 油状物が、スクワラン、スクワレン、シンセラン4、落花生油、ツバキ油、大豆油、流動パラフィン、およびオレイン酸エチルの中から選ばれる1または複数の油状物の混合物である、[1]~[6]のいずれか記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[8] 油状物が、スクワラン、スクワレン、大豆油、流動パラフィンおよびオレイン酸エチルの中から選ばれる2種類の油状物の混合物である、[7]記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[9] 油状物が、大豆油、流動パラフィンおよびオレイン酸エチルの中から選ばれる1種の油状物とスクワランとの混合物である、[8]記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[10] 油状物が、オレイン酸エチルとスクワランとの1:1の混合物である、[9]記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[11] 油状物が、スクワランである、[7]記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)、

[12] 細菌-CWSがBCG-CWSであって、BCG-CWS約0.67gに対して、スクワラ

ン 6. 6g～35.2g を含有することを特徴とする、[1]～[5] のいずれか記載の細菌-CWS混合油状物（ペースト）、

[13] 以下の（1）および（2）の工程を含むことを特徴とする、細菌-CWS混合油状物（ペースト）の製造方法、

（1）細菌-CWS、および油状物を、有機溶媒中で混合する工程、

（2）（1）の有機溶媒を留去する工程、

[14] 有機溶媒がエーテル系溶媒である、[13] 記載の製造方法、

[15] 有機溶媒が炭化水素系溶媒、またはハロゲン化炭化水素系溶媒である、[13] 記載の製造方法、

[16] 有機溶媒がハロゲン化炭化水素系溶媒であって、該ハロゲン化炭化水素系溶媒が、1, 2-ジクロロエタン、クロロホルム、またはジクロロエタンである、[15] 記載の製造方法、

[17] 有機溶媒が炭化水素系溶媒であって、該炭化水素系溶媒が、ヘプタン、またはヘキサンである、[15] 記載の製造方法、

[18] 有機溶媒が、5～20% (V/V) のアルコール系溶媒を含むことを特徴とする、[15]～[17] のいずれか記載の製造方法、

[19] [13]～[18] のいずれか記載の製造方法によって得られる細菌-CWS混合油状物（ペースト）、

[20] 細菌がBCG菌であることを特徴とする [19] 記載の混合油状物、

[21] 油状物がスクワラン、または流動パラフィンであることを特徴とする、

[19] または [20] 記載の混合油状物（ペースト）、

[22] [1]～[12]、および [19]～[21] のいずれか記載の細菌-CWS油状物（ペースト）、界面活性剤、および安定化剤を含有することを特徴とする水中油型エマルション製剤、

[23] 水懸濁液 2Lあたり、0.66g～3.35g の細菌-CWS、および 0.4%～8% の油状物を含有することを特徴とする、[22] 記載の水中油型エマルション製剤、

[24] 安定化剤として 1～10% のマンニトールを含有する [22] または [23] 記載の水中油型エマルション製剤、

[25] 界面活性剤として0.01%~1.0%のポリエチレンオキシソルビタン脂肪酸エステルを含有する[22]~[24]のいずれか記載の水中油型エマルジョン製剤、

[26] ポリエチレンオキシソルビタン脂肪酸エステルがツイーン80である[25]記載の水中油型エマルジョン製剤、

[27] 以下の①~②の特徴を有する[22]~[26]のいずれか記載の水中油型エマルジョン製剤、

①エマルジョン油滴粒子径が、0.2~30 μ mである。

②細菌-CWSが油滴中に包含され、レクチン反応が陰性を示す。

[28] エマルジョン油滴粒子径において、D10%:0.5 μ m以上、D90%:20 μ m以下であることを特徴とする[27]記載の水中油型エマルジョン製剤、

[29] 以下の(1)~(2)の工程を含むことを特徴とする、[22]~[28]のいずれか記載の水中油型エマルジョン製剤の製造方法、

(1) [1]~[12]、および[19]~[21]のいずれか記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)と、界面活性剤を含む水溶液の混合液を、曇天以上の温度で乳化する工程、

(2) 安定化剤を含む水溶液を加えて希釈する工程、

[30] 前項(2)の工程が、曇点以下の温度で実施されることを特徴とする[29]記載の製造方法。

[31] 前項の(1)における乳化する工程が、以下の(3)~(4)の工程を含むことを特徴とする[29]又は[30]記載の製造方法、

(3) [1]~[12]、および[19]~[21]のいずれか記載の細菌-CWS混合油状物(ペースト)と、0.02%~0.8%の界面活性剤を含む水溶液の混合液を乳化する工程(粗乳化工程)、

(4) (3)の混合液に界面活性剤を含む水溶液を加えて界面活性剤濃度を調整し、強撹拌して本乳化を行う工程、

[32] 界面活性剤がポリエチレンオキシソルビタン脂肪酸エステルである[31]記載の製造方法、

[33] 記載のポリエチレンオキシソルビタン脂肪酸エステルがツイーン80で

ある [32] 記載の水中油型エマルジョン製剤の製造方法、
[34] 安定化剤がマンニトールである [29] ~ [33] のいずれか記載の水中油型エマルジョン製剤の製造方法、
[35] [22] ~ [28] のいずれか記載のエマルジョン製剤を凍結乾燥することによって得られる、凍結乾燥製剤、
[36] 粒度分布において、粒子径が、 $0.15 \sim 6 \mu\text{m}$ であることを特徴とする、細菌の細胞壁骨格成分（細菌-CWS）、
[37] 粒度分布において、粒子径が、 $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$ であることを特徴とする、細菌の細胞壁骨格成分（細菌-CWS）、
[38] 粒度分布において、D10%が0.2以上であり、D90%が0.7以下であり、かつ、単一ピークを有することを特徴とする [36] 又は [37] 記載の細菌の細胞壁骨格成分（細菌-CWS）、
[39] 粒度分布において、D10%が 0.23 ± 0.05 であり、D90%が 0.60 ± 0.05 であり、かつ、単一ピークを有することを特徴とする [36] ~ [38] のいずれか記載の細菌の細胞壁骨格成分（細菌-CWS）、
[40] 脂肪族炭化水素系溶媒を含む溶媒中で分散することを特徴とする、[36] ~ [39] のいずれか記載の細菌-CWSの製造方法、
[41] 溶媒が、脂肪族炭化水素系溶媒と、アルコール系溶媒の混合物であることを特徴とする [40] 記載の製造方法、
[42] 溶媒が、5~20%エタノールを含むヘプタンであることを特徴とする [41] 記載の製造方法、
[43] [40] ~ [42] のいずれか記載の製造方法により得られることを特徴とする細菌-CWS、
に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明において、細菌-CWSの由来微生物としては、マイコバクテリア属、ノカルディア属、コリネバクテリウム属（プロプリオネバクテリウム属）、ロドコッカス属、ボルデテラ属、リステリア属細菌が挙げられる。好ましくはマイコバ

クテリウム属菌、およびノカルジア属菌が好ましい細菌である。具体的には、*Mycobacterium tuberculosis*(結核菌)、*Mycobacterium bovis*(BCG菌)、*Mycobacterium phlei* *Mycobacterium avium*、*Mycobacterium mageritense*、*Mycobacterium Kansaii*、ノカルディア・ルブラなどが挙げられる。細菌-CWSは、物理的に細菌を粉砕した後、除核酸、除蛋白、脱脂等の精製工程を経て、不溶性残さとして得られ、その製法自体は公知である (J. Nat. Cancer Inst., 52, 95-101 (1974))。

なお、細胞壁骨格成分の濃度は、乳化製剤時において0.01~10mg/mlになるように使用される。好ましくは、0.1mg/ml~2mg/ml、更に好ましくは0.2mg/ml~1mg/mlである。

本発明の「油状物」としては、Immunology 第27巻、第311~329項(1974年)に記載されているような鉱物油、動植物油が挙げられる。鉱物油としては、例えば、流動パラフィン(ドレコール6VR、モレスコバイオレスU-6、モレスコバイオレスU-8等)、バイオール(Bayol F)、などが挙げられる。植物油としては、例えば、大豆油、シンセラン4、オレイン酸エチル、落花生油、椿油、ゴマ油、AD-65(落花生油とアラセルとアルミニウムモノステアレートの混合物)等が挙げられる。動物油としては、例えば、スクワラン、スクワレンのようなテルペノイド誘導体が挙げられる。また、これら、動植物油、鉱物油の中から選ばれる複数の油の混合物を挙げることもできる。好ましいものとしては、スクワランあるいは例えば、大豆油、オレイン酸エチル、オレイン酸等の植物油(又はそれに由来する油)とスクワランとの混合物、例えば、ドラキオール、各種流動パラフィン等の鉱物油とスクワランの混合物が挙げられる。

より好ましくは、スクワラン、ドラキオール、スクワランと大豆油の混合物、スクワランとオレイン酸エチルの混合物、またはスクワランとドラキオールの混合物を挙げることもできる。

本発明の「粘度」とは、動的粘弾性法により測定されるものであり、例えば、共軸二重円筒型の粘度測定装置を使用して得られる値を言う。本発明では、(株)レオロジ社製共軸二重円筒型の粘度測定装置(MR-300 ソリキッドメータ)を使用し、窒素雰囲気下25℃で粘度を測定することができる。

【0011】

本発明で使用可能な「有機溶媒」は、窒素気流下加熱あるいは減圧下などで簡単に留去可能な有機溶媒が挙げられる。好ましい有機溶媒としては、留去可能な有機溶媒であれば特に限定されるものではないが、疎水性溶媒、および該疎水性溶媒とアルコール系溶媒の混合溶媒を挙げることができる。ここで溶媒としては、ICHの残留溶媒ガイドラインに記載のクラス2、クラス3の溶媒を選択することが好ましい。また、前記疎水性溶媒は、一種類に限らず、適宜数種類組み合わせ使用することができる。具体的には例えばトルエン等の芳香族炭化水素、例えばシクロペンタン、シクロヘキサン、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン等の脂肪族炭化水素、例えばジクロロメタン、クロロホルム、トリクロロエチレン等のハロゲン化炭化水素等、およびテトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒を挙げることができる。

アルコール系溶媒としては、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、またはブタノール等が挙げられ、特に好ましくはエタノールが挙げられる。

該有機溶媒がアルコール系溶媒と疎水性溶媒の混合物である場合、該有機溶媒は、5～30%、好ましくは5～20%、更に好ましくは5～15%のアルコール系溶媒を含有し、疎水性溶媒としては、芳香族炭化水素、脂肪族炭化水素、もしくはハロゲン化炭化水素が用いられる。

より好ましくは溶媒としては、クロロホルム、ジクロロメタン、トリクロロエチレン等のハロゲン化炭化水素、ヘキサン、ヘプタン、ペタン、オクタン等の脂肪族炭化水素、0～20%のエタノールを含む芳香族炭化水素もしくは脂肪族炭化水素が挙げられる。具体的には、5～20%エタノールーヘプタン、5～20%エタノールーヘキサン、5～20%エタノールートルエン、5～20%エタノールーシクロヘキサン、5～20%プロパノールーヘプタン、5～20%イソプロパノールーヘプタン等を例示することができ、好ましくは、10%エタノールーヘプタンが挙げられる。

【0012】

本発明で使用可能な「界面活性剤」としては、医薬品製剤に使用される界面活性剤であれば特に制限されるものではない。例えばリン脂質、非イオン性界面

活性剤などを挙げることができる。リン脂質としては、ホスファチジルアミン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリンシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、またはレシチン等を挙げることができる。また、水素添加されたリン脂質も使用することができる。非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート20）、同モノパルミテート（ポリソルベート40）、同モノステアレート（ポリソルベート60）、または同モノオレート（ポリソルベート80）等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類およびソルビタンモノラウレート（Span 20）、同モノパルミネート（Span 40）、同モノステアレート（Span 60）、同モノオレート（Span 80）等のソルビタン脂肪酸エステル類などを挙げることができる。好ましい界面活性剤としては、卵黄ホスファチジルコリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60（HCO-60）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50（HCO-50）、ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（プルロニックF68）を挙げることができる。より好ましくは、ポリソルベート80が挙げられる。

なお、界面活性剤の濃度は、水中油型エマルジョン製剤において0.01～10% w/wの範囲が適当であるが、0.01～1.0%が好ましい。これら界面活性剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせ使用することができる。

【0013】

「安定化剤」とは、上記エマルジョン製剤のエマルジョンとしての安定性を維持・向上する目的で使用される成分である。本発明で使用可能な安定化剤としては、単糖類、糖アルコール、多糖類、アミノ酸、タンパク質、ウレア、または無機塩などが挙げられる。単糖類および二糖類としては、グルコース、フルクトース、スクロース、ラクトース、トレハロース等が挙げられる。糖アルコールとしては、マンニトール、ソルビトール等が挙げられ、より好ましい糖アルコールとしてはマンニトールが挙げられる。多糖類としては、デキストラン、でんぷん

、マルトデキストリン、セルロース、ポリビニルピロリドン、またはアルギン酸ナトリウム等が好ましいものとして挙げられる。アミノ酸としては、アラニン、グリシン、プロリン等の中性アミノ酸が好ましく、より好ましい中性アミノ酸としてグリシンを挙げることができる。タンパク質としては、アルブミン、ゼラチン、コラーゲン等が好ましいものとして挙げられる。無機塩としては、塩化ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸ナトリウム、炭酸ナトリウム等が挙げられる。

好ましい安定化剤としては単糖類、または糖アルコールが挙げられ、特に好ましい安定化剤としてはマンニトールが挙げられる。

これら安定化剤は、1種類に限らず、適宜、数種類組み合わせて使用することができる。尚、安定化剤の濃度は、水中油型エマルジョン製剤において0.1~20%w/wの範囲が適当であるが、0.1~10%w/wが好ましい。安定化剤の好適な濃度は、安定化剤の種類によって異なるが、製造スケールや各含有成分の含有量に応じて、適宜調整することができる。マンニトールの場合、水中油型エマルジョンにおける濃度は、好ましくは1~10%、更に好ましくは1~5%である。

尚、凍結乾燥前の、製造中間体としての水中油型エマルジョンにおける各成分の濃度は、凍結乾燥製剤を復水して生体に投与する場合の水中油型エマルジョンにおける各成分の濃度と異なってもよい。

【0014】

本発明における凍結乾燥製剤を再分散するために使用される分散溶媒は、エマルジョン粒子の分散媒体となるものであり、注射用蒸留水、生理食塩水等が挙げられるが、注射可能な分散溶媒であれば特に限定されない。

【0015】

本発明に係る第1の態様は、水中油型エマルジョン製剤、および凍結乾燥製剤を製造する際に好適な原料となる、細菌-CWSを有効成分として含有する混合油状物（ペースト）である。すなわち、細菌-CWSと油状物との混合油状物（ペースト）であり、約0.7poise（25℃）以下の粘度、好ましくは約0.2~約0.6poise（25℃）の粘度を示すことを特徴とする、細菌-CWS混合油状物（ペースト）である。更に好ましくは、約0.49~0.55（25℃）の粘度を

示す細菌-CWS混合油状物（ペースト）である。

複数の油との混合物を使用する場合には、それぞれの油を適切な組成比で混合して使用できるが、菌体との混合時の粘度が約 0.6 poise (25℃) 以下の粘度になるような組成比であることが望ましい。さらに、懸濁後安定な凍結乾燥製剤を作成するためには、それぞれの油の組成比が、菌体との混合時の粘度が約 0.2 poise (25℃) 以上になるような組成比であることが望ましい。

具体的には、細胞壁骨格成分約 0.66 g に対して、スクワランであれば、約 8.4 g ~ 35.2 g 等の組成が挙げられる。

前記の混合油状物（ペースト）は、(1) 細菌-CWS、油状物、および有機溶媒を混合攪拌する工程、および、(2) 前記 (1) の有機溶媒を留去し、細菌-CWS混合油状物（ペースト）を得る工程を経て、大量スケールで製造することができる。

前記 (1) において用いられる有機溶媒の量としては、細菌-CWS 0.67 g あたり、50 ml ~ 500 ml が挙げられる。原料を加える順序については特に限定は無い。また、これらの原料を混合攪拌する時間は特に限定されないが、10 分間 ~ 1 時間が好ましい。

前記 (2) において、溶媒を留去するための加熱温度としては、溶媒の沸点、蒸気圧に応じて適宜選択することが可能である。なお、高温になれば細胞壁骨格成分の失活が生じるため、失活の生じない 100℃ 以下の温度が望ましい。好ましくは 80℃ 以下である。

溶媒を留去する工程は、常圧下もしくは減圧下に行うことができる。

【0016】

また、本発明の細菌-CWS混合油状物（ペースト）は、細菌-CWSの粒子径が $0.1\mu\text{m}$ ~ $20\mu\text{m}$ であり、好ましくは $0.15\mu\text{m}$ ~ $6\mu\text{m}$ 、更に好ましくは $0.2\mu\text{m}$ ~ $2\mu\text{m}$ である。すなわち、(1) 粘度が約 0.2 ~ 0.6 poise (25℃) であり、(2) 細菌-CWSの粒子径が $0.15\mu\text{m}$ ~ $6\mu\text{m}$ である細菌-CWS混合油状物（ペースト）等も又、本発明の好ましい態様である。

【0017】

本発明に係る第2の態様は、均一な、粒度分布を有する、細菌-CWSを有効

成分として含有する水中油型エマルジョン製剤である。すなわち、前記細菌-CWS 混合油状物を含み、かつ、0.1%~20%、好ましくは1%~10%の安定化剤、0.01%~10%、好ましくは0.01%~1.0%の界面活性剤を含むことを特徴とする、水中油型エマルジョン製剤である。

具体的には、2Lあたり、0.67g~3.35gの細菌-CWSおよび、0.1~10%w/w、好ましくは0.4~8%w/wのスクワランを含み、かつ、1%~10%w/wの安定化剤、0.01%~1.0%w/wの界面活性剤を含むことを特徴とする、水中油型エマルジョン製剤が挙げられる。

【0018】

該安定化剤としては、グリシン等のアミノ酸の場合2.25% (300mM) ~ 11.25% (1500mM)、好ましくは約6.75% (900mM) であり、マンニトール等の糖アルコールの場合1%~5%、好ましくは約3%を含有する水中油型エマルジョン製剤が好ましい態様として挙げられる。更に、前記公知製剤においてグリシンのかわりにマンニトールを安定化剤として用いることにより、等張と同程度の濃度で用いることができるので、より生体に負担の少ない安定な製剤を製造することができる。

【0019】

本発明の水中油型エマルジョン製剤を製造する方法については、特に限定されないが、国際公開公報 (W000/3724) に記載された方法等を用いることができる。例えば、前記の方法等で製造した細菌細胞壁骨格成分混合油状物 (ペースト) を、2段階乳化方法等を用いて乳化する方法、すなわち、下記の乳化方法1、および乳化方法2が挙げられる。

乳化方法1:

- 1) 細菌細胞壁骨格成分油状混合物 (ペースト) に、低濃度 (油濃度の約10%以下) の界面活性剤を含む水溶液を加えて、緩やかに攪拌して粗乳化を行う工程、
- 2) 前記1) の粗乳化エマルジョン溶液に、所望の濃度を得るべく、目的の最終濃度となる量の界面活性剤、および安定化剤を加えて、エマルジョン溶液の濃度を調整し、室温~100℃で、分散・乳化機器で強く攪拌して本乳化を行う工程

を経て、本発明の水中油型エマルション製剤を調製することができる。

本発明で使用可能な分散・乳化機器としては、例えばPotter-Elvehjem型ホモジナイザー、ホモキサー、超音波ホモジナイザー、マイクロフルイダイザー（商品名）、ナノマイザー（商品名）、アルティマイザー（商品名）、マントン-ガウリンホモジナイザー型高圧ホモジナイザー等の分散・乳化機により、分散もしくは乳化を行って所望の水中油型エマルション製剤を得ることが出来る。製造上の都合によっては、水中油型エマルションを調製後、賦形剤、安定化剤等の添加剤を添加しても良い。

【0020】

乳化方法2

4) 細菌細胞壁骨格成分油状混合物（ペースト）に、低濃度（油濃度の約10%以下）の界面活性剤を含む水溶液を加えて、緩やかに攪拌して粗乳化を行う工程、

5) 前記4)の粗乳化エマルション溶液に、最終濃度が約0.1%～1.0%となるような界面活性剤を加えて、エマルション溶液の濃度を調整し、室温～100℃で、分散・乳化機器で強く攪拌して本乳化を行う工程、

6) 前記5)のエマルション溶液を、使用する安定化剤がアミノ酸・無機塩等の電解質である場合は必要に応じて曇点以下の温度まで冷却した後、所望の濃度を得るべく、最終濃度が約0.1%～1.0%となるような界面活性剤、および最終濃度が1.0%～10%となるような安定化剤を含む水溶液を加えて希釈する工程、を経て、本発明の水中油型エマルション製剤を調製することができる。前記6)において、好ましくは、前記5)で得られるエマルション溶液を2倍～10倍に希釈して水中油型エマルション製剤を調製することができる。

【0021】

前記乳化方法2を用いて、本発明の水中油型エマルション製剤を製造することにより、乳化方法1を用いた製造方法においては、安定化剤としてアミノ酸、無機塩などの電解質を含むエマルション製剤を製造する場合に懸念される、界面活性剤の析出が避けられる。しかも乳化方法2の6)で表される希釈工程によっ

て、エマルションの粒度分布は全く変化しない。また、乳化方法1を用いて大量製造を実施する場合、製造スケールに応じた乳化機器が必要であり、製造スケールの限界であった。しかし、乳化方法2を用いて、高濃度エマルション溶液を中間体として用いることにより、1回あたりに製造できる水中油型エマルション製剤量が増大するという利点がある。

【0022】

上記の乳化方法1、または乳化方法2等の水中油型エマルション製剤の製造工程においては、必要に応じて、等張化剤を加えてもよい。これら等張化剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせて使用することができる。該等張化剤は、凍結乾燥品を凍乾ケーキとして形成させるための賦形剤を兼ねることができる。該等張化剤もしくは賦形剤としては、糖類、アミノ酸、ウレア、無機塩等が挙げられる。糖類としては、単糖類、二糖類、糖アルコールが挙げられる。単糖類としては、グルコース、フルクトース等、二糖類としては、マルトース、ラクトース、トレハロース、スクロース等、糖アルコールとしては、マンニトール、ソルビトール等が挙げられる。アミノ酸としては、アラニン、グリシン、リシン、アルギニン、プロリン等が挙げられる。これらの等張化剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせて使用することができる。等張化剤としては、上記安定化剤として挙げられた物質を使用することができ、安定化剤は等張化剤を兼ねていてもよい。また、等張化剤として、安定化剤とは異なる物質を選択することも可能である。尚、等張化剤の濃度は、他の成分の含有量に応じて適宜設定されるが、通常0.1%~30%w/wの範囲が適当である。

【0023】

本発明の水中油型エマルション製剤は、エマルションの油滴の粒子径が0.2~30 μ m、好ましくは0.2~20 μ mであり、平均粒子径としては2~3 μ mが好ましい。細菌-CWSが油滴中に包含されている。

本発明の水中油型エマルション製剤において、細菌-CWSが油状物で被覆されているか否かは、レクチンによる細胞壁骨格成分の凝集反応を利用して検定することができる。該検定方法については、国際公開公報W000/3724に記載された方法等を用いることができる。

すなわち、(1)エマルション油滴の粒子径が $0.2 \sim 10 \mu\text{m}$ 、平均粒子径が、 $2 \sim 3 \mu\text{m}$ であり、(2)細菌-CWSが油滴中に包含され、レクチン反応が陰性を示すことを特徴とする水中油型エマルション製剤もまた、本発明の態様として挙げられる。また、該エマルション油滴の粒子径において、好ましくはD10%: $0.5 \mu\text{m}$ 以上、D90%: $20 \mu\text{m}$ 以下である。

【0024】

本発明に係る第3の態様は、前記水中油型エマルション製剤を凍結乾燥することによって得られる凍結乾燥製剤である。

前記凍結乾燥製剤は、前記水中油型エマルション製剤を、凍結乾燥させることにより、製造することができる。すなわち本発明に係る凍結乾燥製剤は、水中油型エマルション製剤を凍結乾燥処理し、最後に通常はバイアル内部を窒素置換し、打栓を行うことにより得ることができる。

水中油型エマルション製剤を凍結乾燥する際、凍結乾燥温度、および時間等は特に限定されず、例えば、国際公開公報W000/3724に記載された方法を挙げることができる。

【0025】

該凍結乾燥製剤を再分散させて、水中油型エマルション製剤を復元するために用いる分散溶媒としては、前記等張液等を用いることができる。該凍結乾燥製剤は、適当な分散溶媒の添加により速やかに再分散し、凍結乾燥前と同等の粒度分布、および安定性を有する水中油型エマルションが得られる。分散溶媒の液量は、場合によって異なり、特に制限はないが、凍結乾燥前の液量の、好ましくは0.5~4倍量の範囲であればよい。

【0026】

本発明の第4の態様は、粒度分布において、粒子径が $0.15 \sim 6 \mu\text{m}$ であり、好ましくは粒子径が $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$ であることを特徴とする、細菌の細胞壁骨格成分（細菌-CWS）に関する。また、粒子径において、D10%: $0.2 \mu\text{m}$ （ここで「D10%: $0.23 \mu\text{m}$ 」とは、粒度分布において、粒子径の小さい側から積算して10%に達した時の粒子径を表す。すなわち、細菌-CWSの90%までが粒子径 $0.23 \mu\text{m}$ 以上であることを意味する。）以上であり、かつD90%: $0.7 \mu\text{m}$ （ここで「D90%: $0.7 \mu\text{m}$

m」とは、粒度分布において、粒子径の大きい側から積算して10%に達した時の粒子径を表す。すなわち、細菌-CWSの90%までが粒子径 $0.7\mu\text{m}$ 以下であることを意味する。)以下の細菌-CWSであり、更に好ましくは、 $D10\%:0.23\pm0.05\mu\text{m}$ でありかつ $D90\%:0.6\pm0.05\mu\text{m}$ である。

また本発明には、前記細菌の細胞壁骨格成分(細菌-CWS)を含有する混合油状物(ペースト)や、該油状物から調製されるエマルション製剤、および凍結乾燥製剤も含まれる。すなわち、上記細菌-CWSを含有したエマルション製剤(油滴)の粒子径が $0.2\sim30\mu\text{m}$ 、好ましくは $0.3\sim20\mu\text{m}$ 、更に好ましくは、 $1\sim10\mu\text{m}$ であることを特徴とする、エマルション製剤や凍結乾燥製剤が挙げられる。また、

本明細書において、粒子径は、粒度分布を測定することにより得られる。該粒度分布は、当業者に公知の方法で測定することができるが、具体的には、細菌-CWSの溶媒懸濁液の場合は、レーザー回折式粒度測定装置(SALD3000;島津製作所製)や、マイクロトラックUPA(ハネウエル社製)を用いて、測定することができるが、細菌-CWSの粒子径が $1\mu\text{m}$ 以下の場合には好ましくはマイクロトラックUPAを用いて測定することができる。具体的には、BCG-CWSを、約 0.1mg/mL の濃度で溶媒に懸濁したものを測定サンプルとする。

また、細菌-CWSの混合油状物(ペースト)や、エマルション製剤の場合には、レーザー回折式粒度測定装置(SALD3000;島津製作所製)を用いて測定することができる。具体的には、本発明の細菌-CWSの混合油状物(ペースト)を、約300倍以上に油状物で希釈して測定サンプルとすることができ、好ましくは $0.1\sim0.2\text{mg/mL}$ の濃度となるように測定サンプルを調製すればよい。

【0027】

本発明の水中油型エマルション製剤は、凍結乾燥品を凍乾ケーキとして形成させるために、必要に応じて賦形剤を添加することができる。該賦形剤としては前記と同様のものが挙げられる。

本発明の凍結乾燥製剤、および水中油型エマルション製剤は、医薬品製剤に使用し得る酸化防止剤、防腐剤、等張化剤、賦形剤、緩衝剤などを、前記の各製造工程を含む任意の段階で、必要に応じて添加することができる。添加濃度とし

ては、水中油型エマルジョン製剤において10%w/w以下が好ましく、更に好ましくは、前記安定化剤が、等張化剤および賦形剤としての効果を兼ねている。

【0028】

本発明に係る水中油型エマルジョン製剤は、注射など非経口で投与できる。投与形態は、治療目的などにより異なり、特に制限されるものではない。非経口的に投与する場合、通常用いられる投与形態として例えば、注射剤として皮膚より投与すること等ができる。

投与量、投与回数は対象とする疾患、患者の症状、年齢、体重、性別等によって異なるが、非経口投与する場合、特に注射剤として使用する場合には、通常は成人に対して週1回若しくは4週1回の投与で1回当たり10～250 μ gの範囲、好ましくは25～200 μ gの範囲を投与することができる。

【0029】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

実施例1

細菌-CWS (BCG-CWS) の混合油状物 (ペースト) の調製

細胞壁骨格成分としてBCG-CWS670mgを用いて、油状物として使用するスクワラン8.4gとトルエン200mLの混合液に加え、振とうあるいは超音波により室温で分散した。その後、窒素あるいは空気気流下60℃に加熱しトルエンを留去し、BCG-CWSの混合油状物 (ペースト) を得た。

該混合油状物 (ペースト) に関して、共軸二重円筒型粘度測定器 (MR-300ソリキッドメータ: (株) レオロジ社製) を用いて25℃での粘度を測定した。その結果、0.545poiseであることが示された。

また、同様にして、油状物として、スクワランとオレイン酸エチルの混合物を8.4g使用して、BCG-CWの混合油状物 (ペースト) を得た。同様に、共軸二重円筒型粘度測定器 (MR-300ソリキッドメータ: (株) レオロジ社製) を用いて25℃での粘度を測定した。これらの結果を表1に示す。

【表 1】

	BCG-CWS 量	スクワラン量	オレイン酸エチル量	粘度 (poise)
①	670mg	8.4g	0	0.545
②	同上	6.3g	2.1g	0.258
③	同上	4.2g	4.2g	0.260
④	同上	2.1g	6.3g	0.165
⑤	同上	0	8.4g	0.112
⑥	0	8.4g	0	0.239

表 1 に示されるように、スクワラン自体の粘度は 0.236 であり、これに細胞壁骨格成分の BCG-CWS が上記のように混合された場合、その混合油状物の粘度は 0.545 となる。より粘度の低いオレイン酸エチルの割合を増やすと、BCG-CWS の混合油状物の粘度は次第に低くなった。

【0030】

実施例 2細菌-CWS (BCG-CWS) の混合油状物 (ペースト) の調製

細胞壁骨格成分として BCG-CWS 670mg を用い、油状物として大豆油 8.4g を使用して、実施例 1 と同様にして油状混合物 (ペースト) を調製し、粘度を測定した。

また、油状物として、シンセラン 4、ドラケオールを使用し、同様に油状混合物 (ペースト) を調製し、粘度を測定した。

以上の結果を表 2 に示す。

【表 2】

	BCG-CWS 量	油状物の種類 (8.4 g)	粘度 (poise)
①	670mg	大豆油	6.95
②	同上	スクワラン	0.55
③	同上	シンセラン 4	0.49
④		ドラケオール	0.28
⑤	同上	オレイン酸エチル	0.11

表 2 に示されるように、スクワラン以外の油状物を使用した場合の BCG-CWS 混合油状物の粘度は、使用する油状物によって大きく変動する。

【0031】

実施例 3

油状物 (スクワラン) の量の変化と粘度の変化

実施例 1 と同様にして実施した。細胞壁骨格成分として BCG-CWS670mg を用いたが、油状物として使用するスクワランの量を 4.2 g から 33.6 g へと変化させてその粘度変化を測定した。

その結果を表 3 に示す。

【表 3】

	BCG-CWS 量	スクワラン量	粘度 (poise)
①	670mg	4.2 g	0.888
②	同上	6.3 g	0.672
③	同上	8.4 g	0.545
④	同上	12.6 g	0.492
⑤	同上	16.8 g	0.429
⑥	同上	33.6 g	0.362

表 3 に示されるように、BCG-CWS に対するスクワランの量比が小さくなれば粘度が増加し、スクワランの量比が大きくなれば粘度が減少する傾向にあ

る。

実施例 4

油状物（スクワラン）の量比の変化とエマルジョン製剤化の可否

細胞壁骨格成分としてBCG-CWS670mgを用いて、スクワラン8.4gとトルエン200mLの混合液に加え、振とうあるいは超音波により室温で分散した。その後、窒素あるいは空気気流下60℃に加熱しトルエンを留去した。ついで、0.02w/w%ポリソルベート80水溶液281.5gを添加し、ホモミキサーを用いて粗乳化を行い、さらに、5.2gの10w/w%ポリソルベート80水溶液を添加し本乳化を行った。最後に、204.2gの10w/w%ポリソルベート80溶液を添加混合し、ポリソルベート80最終濃度を1.0w/w%に調整し、水中油型エマルジョンを得た。その後、4w/w%マンニトール水溶液1500mLを添加し、2Lの最終製剤を得た。即ち、BCG-CWSの原体濃度として、0.3mg/mlのエマルジョン製剤が得られる。

同様にして、実施例3のスクワラン量でエマルジョン製剤を調製し、乳化直後の粒度分布、乳化直後の不溶性異物の有無等を調べて、エマルジョン製剤の安定性等の面で調製の可否を判断した。

その結果を表4に示す。

【表 4】

	BCG-CWS 量	スクワラン量	粘度 (poise)	エマルジョン製剤の可否
①	670mg	4.2g	0.888	×
②	同上	6.3g	0.672	△
③	同上	8.4g	0.545	○
④	同上	12.6g	0.492	○
⑤	同上	16.8g	0.429	○
⑥	同上	33.6g	0.362	○

実施例 3 記載の BCG-CWS の混合油状物（ペースト）を使用してエマルジョン製剤を調製する場合、表 4 に示されるように、約 0.7 以下のペーストを使用した場合には良好なエマルジョン製剤が調製される。一方、それより粘度が高い場合、例えば 0.888 と、粘度が高い場合であれば、エマルジョンの製剤化は困難であることがわかった。すなわち、粘度の上昇に伴い、一部の油滴において過乳化が起こり、非常に少量の油に包埋された原薬の塊（均一に懸濁されずに凝集する物質）が出現し、製剤の性状と安定性を著しく低下させることがわかった。

一方、粘度：0.670 程度では、原薬の塊が出現することはないが、その粒度分布は、均一性が乏しかった。また、粘度 0.545 以下の製剤では、均一性に富むシャープな粒度分布を示した。

【0032】

実施例 5

油状物の種類とエマルジョン製剤化の可否

油状物として実施例 2 の種類のものを使用し、実施例 4 と同様にしてエマルジョンを調製し、製剤化の可否を評価した。すなわち、①乳化中の凝集物出現の有無、②乳化直後の粒度分布、③凍結乾燥前後での粒度分布維持性、④凍結乾燥品再懸濁後の性状）を調べた。

その結果を表 5 に示す。

【表 5】

	BCG-CWS 量	油状物の種類 (8.4 g)	粘度 (poise)	製剤化の可否
①	670mg	大豆油	6.95	×
②	同上	スクワラン	0.55	○
③	同上	シンセラン 4	0.49	○
④	同上	ドラケオール	0.28	○
⑤	同上	オレイン酸エチル	0.11	○

表 5 に示されるように、油状物の種類に関係なく、BCG-CWS の混合油状物の粘度が約 0.55 以下のものを使用して、エマルション製剤を調製すれば、エマルション製剤として良好なものが得られた。すなわち、①乳化直後の粒度分布が、平均粒子径 2～3 μm でありシャープな単一ピークが得られた。②凍結乾燥前後において粒度分布に変化が無かった。③凍結乾燥品を再懸濁した後にバイアルへの製剤付着やそれに伴う製剤中原薬濃度低下が認められなかった。特に、粘度：0.49～0.55 の製剤が、良好な結果を示した。

【0033】

実施例 6油状物の組成とエマルション製剤化の可否

油状物として実施例 1 の組成のものを使用し、実施例 4 と同様にしてエマルションを調製し、製剤化の可否を評価した。その結果を表 6 に示す。

【表 6】

	BCG-CWS 量	スクワラン 量	オレイン酸エチル量	粘度 (poise)	製剤化の可否
①	670mg	8.4g	0	0.545	○
②	同上	6.3g	2.1g	0.258	○
③	同上	4.2g	4.2g	0.260	○
④	同上	2.1g	6.3g	0.165	○
⑤	同上	0	8.4g	0.112	○
⑥	0	8.4g	0	0.239	○

表 6 に示されるように、油状物の組成（スクワランとオレイン酸エチルの混合比）が変化してもエマルジョン製剤の性質にはあまり大きな影響を与えず、BCG-CWS の混合油状物（ペースト）の粘度が 0.545 以下であれば、良好なエマルジョン製剤が調製されることが示されている。

【0034】

実施例 7混合油状物（ペースト）における油状物（スクワラン）の量の変化と凍結乾燥製剤化の可否

細胞壁骨格成分として BCG-CWS 670mg を用いて、スクワラン 8.4g とトルエン 200mL の混合液に加え、振とうあるいは超音波により室温で分散した。その後、窒素あるいは空気気流下 60℃ に加熱しトルエンを留去した。ついで、0.02w/w% ポリソルベート 80 水溶液 281.5g を添加し、ホモミキサーを用いて粗乳化を行い、さらに、5.2g の 10w/w% ポリソルベート 80 水溶液を添加し本乳化を行った。最後に、204.2g の 10w/w% ポリソルベート 80 溶液を添加混合し、ポリソルベート 80 最終濃度を 1.0w/w% に調整し、水中油型エマルジョンを得た。その後、4w/w% マンニトール水溶液 1500mL を添加し、2L の最終製剤を得た。

この水中油型エマルジョン製剤をバイアルに 10mL ずつ分注し、凍結乾燥を行って本発明の凍結乾燥製剤を得た。凍結乾燥は、凍結乾燥機（GT-6、フィンテ

ック社製)を用いて行った。

同様に、実施例3のスクワラン量で凍結乾燥製剤を調製し、凍結乾燥製剤の復水安定性、粒度分布等の面で調製の可否を判断した。

【0035】

その結果を表7に示す。

【表7】

	BCG-CWS 量	スクワラン量	粘度 (poise)	凍結乾燥製剤の 可否
①	670mg	4.2g	0.888	×
②	同上	6.3g	0.672	△
③	同上	8.4g	0.545	○
④	同上	12.6g	0.492	○
⑤	同上	16.8g	0.429	○
⑥	同上	33.6g	0.362	○

表7で示されるように、エマルションの凍結乾燥製剤の良否もBCG-CWSの混合油状物（ペースト）の粘度によって影響を受ける。BCG-CWSの混合油状物の粘度が0.672以下の場合であれば良好な凍結乾燥製剤が調製される。0.545以下の場合であれば、更に良好な凍結乾燥製剤が調製されることがわかった。

【0036】

実施例8

油状物の組成と凍結乾燥製剤化の可否

細胞壁骨格成分としてBCG-CWS670mgを用いて、スクワラン4.2gとオレイン酸エチル4.2gおよびトルエン200mLの混合液に加え、振とうあるいは超音波により室温で分散した。その後、窒素あるいは空気気流下60℃に加熱しトルエンを留去した。ついで、0.02w/w%ポリソルベート80水溶液281.5gを添加し、ホモミキサーを用いて粗乳化を行い、さらに、5.2gの10w/w%ポリソルベート80水溶液を

添加し本乳化を行った。最後に、204.2gの10w/w%ポリソルベート80溶液を添加混合し、ポリソルベート80最終濃度を1.0w/w%に調整し、水中油型エマルションを得た。その後、4w/w%マンニトール水溶液1500mLを添加し、2Lの最終製剤を得た。

この水中油型エマルション製剤をバイアルに10mLずつ分注し、凍結乾燥を行って本発明の凍結乾燥製剤を得た。凍結乾燥は、凍結乾燥機（GT-6、フィンテック社製）を用いて行った。

同様にして、実施例1スクワラン量でエマルションの凍結乾燥製剤を調製し、凍結乾燥製剤の復水安定性、粒度分布等の面で調製の可否を判断した。

その結果を表8に示す。

【表8】

	BCG-C WS量	スクワラン 量	オレイン酸エ チル量	粘度 (poise)	凍結乾燥製 剤の可否
①	670mg	8.4g	0	0.545	○
②	同上	6.3g	2.1g	0.258	○
③	同上	4.2g	4.2g	0.260	○
④	同上	2.1g	6.3g	0.165	×
⑤	同上	0	8.4g	0.112	×
⑥	0	8.4g	0	0.239	○

実施例7に示されるように、エマルションの凍結乾燥製剤は、使用されるBCG-CWSの混合油状物（ペースト）の粘度に影響を受け、良好な凍結乾燥製剤は混合油状物の粘度が0.545以下であることが示されたが、上記表8からは、混合油状物の粘度が低すぎても良好な凍結乾燥製剤は得られないことが示されている。従って、良好なエマルションの凍結乾燥製剤が得られるための、好適な混合油状物の粘度は、0.258から0.545の範囲であることが分かる。

【0037】

添加し本乳化を行った。最後に、204.2gの10w/w%ポリソルベート80溶液を添加混合し、ポリソルベート80最終濃度を1.0w/w%に調整し、水中油型エマルションを得た。その後、4w/w%マンニトール水溶液1500mLを添加し、2Lの最終製剤を得た。

この水中油型エマルション製剤をバイアルに10mLずつ分注し、凍結乾燥を行って本発明の凍結乾燥製剤を得た。凍結乾燥は、凍結乾燥機（GT-6、フィンテック社製）を用いて行った。

同様にして、実施例1スクワラン量でエマルションの凍結乾燥製剤を調製し、凍結乾燥製剤の復水安定性、粒度分布等の面で調製の可否を判断した。

その結果を表8に示す。

【表8】

	BCG-C WS 量	スクワラン 量	オレイン酸エ チル量	粘度 (poise)	凍結乾燥製 剤の可否
①	670mg	8.4 g	0	0.545	○
②	同上	6.3 g	2.1 g	0.258	○
③	同上	4.2 g	4.2 g	0.260	○
④	同上	2.1 g	6.3 g	0.165	×
⑤	同上	0	8.4 g	0.112	×
⑥	0	8.4 g	0	0.239	○

実施例7に示されるように、エマルションの凍結乾燥製剤は、使用されるBCG-CWSの混合油状物（ペースト）の粘度に影響を受け、良好な凍結乾燥製剤は混合油状物の粘度が0.545以下であることが示されたが、上記表8からは、混合油状物の粘度が低すぎても良好な凍結乾燥製剤は得られないことが示されている。従って、良好なエマルションの凍結乾燥製剤が得られるための、好適な混合油状物の粘度は、0.258から0.545の範囲であることが分かる。

【0037】

実施例 9油状物の種類とエマルションの凍結乾燥製剤化の可否

油状物として実施例 2 の種類のものを使用し、実施例 7 と同様にしてエマルションの凍結乾燥製剤を調製し、その製剤の可否を評価した。

その結果を表 9 に示す。

【表 9】

	BCG-CWS 量	油状物の種類 (8.4g)	粘度 (poise)	凍結乾燥製剤 の可否
①	670mg	大豆油	6.95	×
②	同上	スクワラン	0.55	○
③	同上	シンセラン 4	0.49	○
④	同上	ドラケオール	0.28	○
⑤	同上	オレイン酸エチル	0.11	×

表 9 に示されるように、油状物の種類が相違してもエマルションの凍結乾燥製剤化には大きな影響は与えず、使用する BCG-CWS の混合油状物（ペースト）の粘度の大きく影響されることが分かった。また、実施例 8 を参考にすれば、良好な凍結乾燥製剤が得られるところの BCG-CWS 混合油状物の好適な粘度は 0.28 から 0.55 であることが示されている。

【0038】

実施例 10

細胞壁骨格成分として BCG-CWS 2640mg を用いて、スクワラン 35.2g および 10% エタノール / 90% ヘプタン 400mL の混合液に加え、振とうあるいは超音波により室温で分散した。その後、窒素気流下 60℃ に加熱し、攪拌下溶媒を留去した。ついで、0.02w/w% ポリソルベート 80 水溶液 924g を添加し、ホモミキサーを用い

て粗乳化 (7,000rpm (逆回転) /min×5分間) を行い、さらに、36.6gの10w/w%ポリソルベート80水溶液を添加し本乳化 (12,000rpm (正転) /min×10分間) を行った。最後に、1.5gの10w/w%ポリソルベート80溶液を添加混合し攪拌 (7,000rpm (逆回転) ×1分間) し、ポリソルベート80最終濃度を0.4w/w%に調整し、水中油型エマルションを得た。その後、4w/w%マンニトール水溶液3500gを添加し、4000gの最終製剤を得た。(このときの処方は、CWS:0.6mg/mL、SQA:0.8w/w%、Tween80:0.1w/w%、マンニトール:3w/w%)

この水中油型エマルション製剤をバイアルに2mLずつ分注し、凍結乾燥を行って本発明の凍結乾燥製剤を得た。凍結乾燥は、凍結乾燥機 (GT-6、フィンテック社製あるいはULVAC13A、日本真空社製) を用いて行った。

【0039】

実施例 11

分散溶媒についての検討

各種分散溶媒を用いて、実施例 10と同様の方法で、エマルション製剤を調製した。すなわち、原薬 (210mg) を各種有機溶媒 (ヘキサン、ヘプタン、クロロホルム、ジクロロエタン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン; 各20ml) 中に、超音波処理により分散し、分散原薬を調製した後、更に、ポッター型ホモジナイザー (20ml 型) により攪拌 (3000rpm x 5分) した。次に、スクワラン (2.64g) を混合し分散原薬Cを調製し、更に、有機溶媒を留去することにより得られたペーストの粒度分布評価を行った。また、分散原薬についても粒度分布評価を行った。

粒度分布は、分散原薬については、0.1mgCWS/mLの濃度で、マイクロトラックUPA (ハネウェル社製)、およびレーザー回折式粒度測定装置 (SALD3000; 島津製作所製) を用いて測定した。また、混合油状物 (ペースト) は、スクワランで希釈し、0.1~0.2mgCWS/mL SQAの濃度で、レーザー回折式粒度測定装置 (SALD3000; 島津製作所製) を用いて測定した。

[結果]

トルエン中に分散された分散原薬の粒度分布を調べた結果、400~600nmに分布するサブミクロンでのピークと、10μmを中心とした大きな粒子の分布の二つに

分かれた。これを更に攪拌するにより分散させた分散原薬の粒度分布を調べた結果、サブミクロンのピークは減少し、数十 μm 付近のブロードなピークが増大した。以上の結果から、トルエン分散原薬をポッター型ホモジナイザーにより均一化することは困難であることが判った。

次に、上記トルエン分散原薬にスクワランを混合した分散原薬の粒度分布、および、これを更にポッター型ホモジナイザーで更に分散して調製したペーストの粒度分布を調べた結果、これらはいずれもスクワランを混合する前の粒度分布をほぼ維持していた。図1にトルエンを分散溶媒に用いた場合のペーストの粒度分布を示した。

一方、分散補助溶媒として、ヘキサン、ヘプタン、クロロホルム、ジクロロエタン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン等において、トルエン分散で見られた数十 μm を中心とした粒度分布は殆ど認められず、サブミクロンから2 μm にかけての単一分布が得られることが判った。90%ヘプタン/10%エタノールを用いた場合の、ペーストの粒度分布結果を図2に示した。図2のとおり、サブピークは無く、0.3~2 μm に単一ピークを持つ均一な混合物が得られていることがわかった。

表10には、各溶媒における溶媒に分散したBCG-CWS原薬をマイクロトラックUPAで測定した場合の、D10%値、D90%値、および平均粒子径の実測値を示す。

【表10】

溶媒	D10% (μm)	D90% (μm)	平均粒子径
10%エタノール/ヘプタン	0.23	0.60	0.41
5%エタノール/ヘプタン	0.23	0.70	0.41
20%エタノール/ヘプタン	0.25	0.65	0.43
ヘプタン	1.19	5.07*	2.90*
トルエン	0.33	2.08*	1.03*

* μm オーダーの値については、機械の特性から精度が低いので、表11の値を参照することが好ましい。

以下の表 11 には、各溶媒における溶媒に分散したBCG-CWS原薬をSALD3000で測定した場合の、D10%値、D90%値、および平均粒子径の実測値を示す。

【表 11】

溶媒	D10% (μm)	D90% (μm)	平均粒子径
10%エタノール/ヘプタン	0.11	0.89	0.40
ヘプタン	0.45	1.10	0.71
トルエン	0.39	20.86	2.65
トルエン	0.33	2.08*	1.03*

* μm オーダーの値については、機械の特性から精度が低いので、表 10 の値を参照することが好ましい。

以下の表 12 には、各溶媒における溶媒にBCG-CWS混合油状物をスクワランで希釈し、SALD3000で粘度を測定した場合の、D10%値、D90%値、および平均粒子径の実測値を示す。

【表 12】

溶媒	D10% (μm)	D90% (μm)	平均粒子径
10%エタノール/ヘプタン	0.38	0.70	0.52
ヘプタン	0.52	5.50	1.17
トルエン	0.39	9.91	1.05

【0040】

【発明の効果】

本発明により、安定な水中油型エマルジョン製剤が提供できる。また、固体成分を油状物中に含有する安定で凍結乾燥可能な水中油型エマルジョン製剤とその凍結乾燥製剤が提供できることから、この方法を用いて、BCG-CWS製剤を創出でき、免疫賦活がん療法が、より効果的に実施できるようになった。

【0041】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 分散溶媒にトルエンを用いた場合のペーストの粒度分布を示した

。

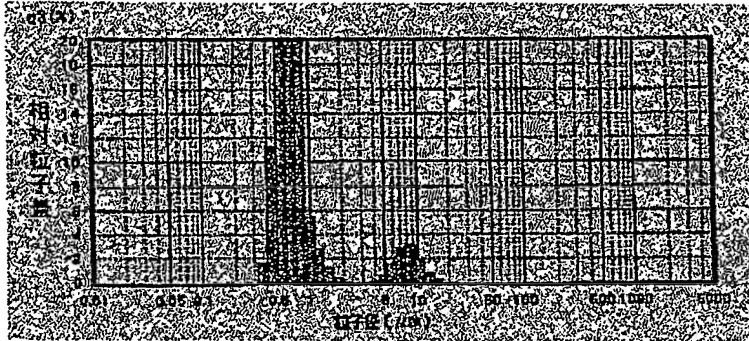
【図 2】 分散溶媒に90%ヘプタン/10%エタノールを用いた場合のペーストの粒度分布を示した。

【書類名】

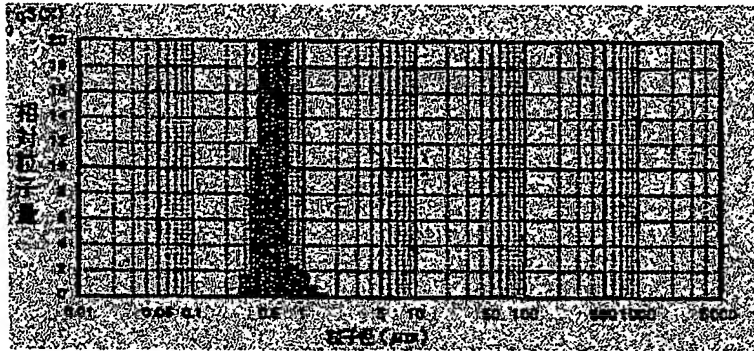
図面

BEST AVAILABLE COPY

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

新規な細菌細胞壁骨格成分製剤の提供。

【解決手段】

細菌細胞壁骨格成分（細菌-CWS）と油状物との混合油状物（ペースト）であり、0.2～0.7poise（25℃）の粘度を有する細菌-CWS混合油状物（ペースト）、該混合油状物を含有するエマルジョン製剤、および凍結乾燥製剤。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-226196
受付番号	50201149947
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 8月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 8月 2日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-226196

出願人履歴情報

識別番号

[000183370]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名

住友製薬株式会社